

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-38763

(43)公開日 平成6年(1994)2月15日

(51)Int.Cl. C 12 N 15/31 15/80 // (C 12 N 15/31 C 12 R 1:645)	識別記号 ZNA	庁内整理番号 8931-4B	F I	技術表示箇所 C 12 N 15/ 00 A 審査請求 未請求 請求項の数 5(全 19 頁)
---	-------------	-------------------	-----	--

(21)出願番号 特願平5-77367	(71)出願人 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
(22)出願日 平成5年(1993)3月12日	(72)発明者 松田 昭生 静岡県富士市駒島2番地の1 旭化成工業 株式会社内
(31)優先権主張番号 特願平4-88418	(72)発明者 村松 周治 静岡県富士市駒島2番地の1 旭化成工業 株式会社内
(32)優先日 平4(1992)3月13日	(74)代理人 弁理士 清水 猛 (外1名)
(33)優先権主張国 日本 (JP)	

(54)【発明の名称】 セファロスボリンC生合成に関与する遺伝子を含むDNA断片

(57)【要約】

【目的】 本発明は、アクリレモニウム・クリソゲナム由来であり、セファロスボリンC生合成に関与する遺伝子を単離し、アクリレモニウム・クリソゲナムの改良にこれを利用することを目的とする。

【構成】 セファロスボリンC生合成に関与する遺伝子群を含有するDNA断片であり、少なくとも配列表に示されるアミノ酸配列をコードする新規な遺伝子を含有するDNA断片。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アクレモニウム・クリソゲナム由来であり、セファロスボリンC生合成に関与する遺伝子を含むDNA断片。

【請求項2】 イソペニシリンN合成酵素遺伝子の近傍に位置し、図3に示す制限酵素地図により規定される請求項1記載のDNA断片。

【請求項3】 配列表（配列番号1）に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む請求項1または2記載のDNA断片。

【請求項4】 配列表（配列番号2）に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む請求項1、2または3記載のDNA断片。

【請求項5】 図3におけるPstI③-EcoRV④間の塩基配列が配列表（配列番号3）で示される請求項1、2、3または4記載のDNA断片。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アクレモニウム・クリソゲナム由来であり、セファロスボリンC生合成に関与する遺伝子を含むDNA断片に関する。

【0002】

【従来の技術】 臨床上重要なセファロスボリン系抗生物質の出発原料であるセファロスボリンCは、糸状菌であるアクレモニウム・クリソゲナムを用いた発酵法により製造されている。従来、該菌のセファロスボリンC生産能力を向上させるために用いられてきた技術は、突然変異生成、それに続く高生産株のランダムスクリーニングであった。しかし、近年、該菌を宿主とする形質転換系の開発〔例えば、Queenerら、Microbiology 1985. American Society for Microbiology, (1985) 468-472〕およびセファロスボリンC生合成酵素遺伝子のクローニングが相次いで行われ、優良菌株の育種に遺伝子工学的アプローチを施す道が開けてきた〔例えば、Skatrudら、BIO/TECHNOLOGY (1989) 7,477〕。セファロスボリンCは、アクレモニウム・クリソゲナムにおいて、3種のアミノ酸を出発原料として、5種類の酵素による6ステップの反応を経て生合成されることが知られている。〔例えば、Martinら、Trends in Biotechnology (1985) 3: 39-44 参照〕。現在までに、これら生合成酵素のうち4種の酵素をコードする遺伝子がそれぞれアクレモニウム・クリソゲナムよりクローニングされ、〔例えば、Samonら、Nature (1985) 318,191、Samsonら、BIO/TECHNOLOGY (1987) 5,1207、Gutierrezら、Journal of Bacteriology (1991) 173,2354-2365、EP0450758〕分子育種に応用されつつある。しかしながら、第3番目のステップ、すなわち、イソペニシリンNからペニシリNへの異性化反応を触媒する酵素であるイソペニシリNエピメラーゼをコードする遺伝子（以後IPNE遺伝子と略す）は未だ単離同定されていない。また、アクレモニウ

2

ム・クリソゲナムには、セファロスボリンC生合成に関与する遺伝子（例えば、セファロスボリンC生合成遺伝子群の発現制御に係わるタンパク質、あるいは合成中間体の膜透過に係わるタンパクをコードする遺伝子）が複数存在することが予想され、上記生合成酵素遺伝子と同様に、これらの遺伝子もセファロスボリンC生産菌の分子育種に有益な手段を提供すると考えられる。しかしながら、IPNE遺伝子と同様これら遺伝子の解析は全く行われていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、アクレモニウム・クリソゲナム由来であり、セファロスボリンC生合成に関与する遺伝子を単離し、アクレモニウム・クリソゲナムの改良に、これを利用することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】 抗生物質の生合成に関与する遺伝子群は、一般にクラスターを形成しているという知見〔例えば、Martinら、Annu. Rev. Microbiol. (1989) 43,173-206〕に基づいて、本発明者らは、既知のセファロスボリンC生合成酵素遺伝子近傍のDNA断片を単離し、遺伝子破壊法を利用することによって、該断片上に存在する遺伝子の機能を解析した。その結果、イソペニシリN合成酵素遺伝子の近傍に位置し、図3に示す制限酵素地図を有するDNA断片上に、セファロスボリンC生合成に関与する遺伝子が少なくとも2個存在していることを見いだし、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、

【0005】 (1) アクレモニウム・クリソゲナム由来であり、セファロスボリンC生合成に関与する遺伝子を含むDNA断片。

(2) イソペニシリN合成酵素遺伝子の近傍に位置し、図3に示す制限酵素地図により規定される(1)記載のDNA断片。

(3) 配列表（配列番号1）に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む(1), (2)記載のDNA断片。

(4) 配列表（配列番号2）に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む(1), (2), (3)記載のDNA断片。

40 (5) 図3におけるPstI③-EcoRV④間の塩基配列が配列表（配列番号3）で示される(1), (2), (3)または(4)記載のDNA断片に関する。

【0006】 また、本研究の過程で、本発明DNA断片の一部をプローブとして使用することにより、配列表（配列番号1）に示すアミノ酸配列を有するタンパク質および配列表（配列番号2）に記載した配列からなるタンパク質を、それぞれコードする2種のcDNAが得られた。各々代表的なクローニングに由来する塩基配列を配列表（配列番号1および2）に示した。これらcDNA化合物も

50 アクレモニウム・クリソゲナム内で機能するプロモータ

一断片（例えば、特開平4-58891）と連結させることにより、本発明DNA断片と同様、アクリレモニウム・クリソゲナムの改良に利用できると考えられる。したがって、図3に示す制限酵素地図により規定されるDNA断片から転写されるRNA（セファロスボリンC生合成に関与するタンパクをコードするm-RNA）に由来するcDNA化合物群も本発明に包含される。本発明に係るDNA断片は、大略下記の工程によって造成することができる。

【0007】(1) アクリレモニウム・クリソゲナムから染色体DNAを抽出し、適当な制限酵素（例えば、MboI等）で部分分解する。

(2) (1)で得られたDNA断片を適当なベクターに組み込み、アクリレモニウム・クリソゲナムの染色体DNAライブラリーを構築する。

(3) (2)で得られたライブラリーの中から、合成DNAプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、イソペニシリンN合成酵素遺伝子の少なくとも一部を含むクローネンを単離する。

(4) 該クローネンより組換えDNAを抽出し、制限酵素解析、サザンハイブリダイゼーション等を行ってイソペニシリンN合成酵素遺伝子の存在位置を確認した後、その下流域（ACVS遺伝子の反対側）を適当なプラスミドベクター（例えば、pUC18）にサブクローニングする。

(5) (4)でサブクローネン化されたDNA断片上で、RNAに転写される領域（機能的遺伝子）を同定する。

(6) 相同組換え現象を利用した遺伝子破壊法により、

(5)で同定した領域内に変異を有するアクリレモニウム・クリソゲナム株を取得する。

(7) 上記(6)で得た変異株のセファロスボリンC生産能を調べ、親株のそれと比較することにより、本遺伝子がセファロスボリンC生合成に関与していることを確認する。

【0008】上記の工程中でDNA、組換え体宿主としての大腸菌等の取扱いに必要な一般的な操作は、当業者間で通常行われているものであり、例えば、Maniatisらの実験操作書（T. Maniatis et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982, 1989）に従えば容易に実施できる。使用する酵素、試薬類もすべて市販の製品を用いることができ、特に断わらない限り、製品で指定されている使用条件に従えば、完全にそれらの目的を達成することができる。上記(1)において、DNA抽出源としては、アクリレモニウム・クリソゲナムATCC11550、アクリレモニウム・クリソゲナムIS-5等の菌株が使用できる。なお、アクリレモニウム・クリソゲナムIS-5株は、平成2年2月5日付で通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に微研菌寄第11232号の寄託番号で寄託されている。

【0009】また、該菌からの全DNA抽出は、例えば、Johnstoneら [Johnstone et al., EMBO Journal (1989) 5: 1307-1311] の方法、もしくは、Minuthら [Minuth et al., Current Genetics (1982) 5: 227-231] の方法に準じて行うことができる。上記(2)におけるベクターとしては、例えば、EMBL3, EMBL4 (STRATAGENE社) 等のラムダファージベクターもしくは、pHC79 (Bethesda Research Laboratories< BRL >社), pBSFPM6 (後述) 等のコスミドベクターを使用することができる。上記(3)で使用するプローブは、既に明かとなっている A. c

hrysogenum 由来のIPNS遺伝子の配列に基づいて設計し、市販の合成機を用いて容易に合成することができる。上記(5)における転写領域は、例えば、(4)で得たプラスミドから適当な制限酵素断片を調製し、該断片を放射能ラベルしたものをプローブとして、アクリレモニウム・クリソゲナムから抽出したRNAとのノーザンハイブリダイゼーションを行うことによっておおまかに推定することができる。あるいは、アクリレモニウム・クリソゲナムに由来するラベル化 cDNA をプローブとして、(4)で得たプラスミドの制限酵素分解物とのサザンハイブリダイゼーションを行うことによっても推定できる。また、該制限酵素断片をプローブとしてアクリレモニウム・クリソゲナム由来のcDNA クローネンを単離し、その構造を決定することによって、さらに細かく転写領域ならびにタンパク質コード領域等を限定することも可能である。なお、アクリレモニウム・クリソゲナムからのRNAの抽出は、例えば、EP-0450758記載の方法に準じて行うことができる。また、cDNAライブラリーの構築、ノーザンハイブリダイゼーション等の操作も、例えば、上記マニアティスらの実験操作書に準じて行うことができる。上記(6)における遺伝子破壊は、例えば Hoskinsらの方法 [Jo Ann Hoskinsら, Curr Genet (1990) 18: 523-530] に準じて行うことができる。なお、本発明者らは、まずセファロスボリン生合成遺伝子の一つであるデアセチルセファロスボリンCアセチルトランスフェラーゼ遺伝子の破壊実験を試み、後述の参考例に示すとおり、該菌においても、特定の遺伝子の破壊株は比較的容易に取得できることを見いたした。なお、遺伝子破壊用プラスミドを構築する際必要となる選択マーカー遺伝子としては、例えば特開平4-58891に記載されている、アクリレモニウム・クリソゲナム内で作用するプロモーターに連結されたハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子、あるいはネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子等を使用することができる。また、破壊用プラスミドによるアクリレモニウム・クリソゲナムの形質転換も公知の方法に準じて行うことができる（例えば、Queenie et al., Microbiology 1985, American Society for Microbiology (1985) 468-472）。上記(7)におけるセファロスボリンC濃度は、例えば、Martinezらが記載した方法 [Eymen Microbiol. Technol. (1985) 7, 389-393] に準じて測定することができる。

【0010】以下、実施例により本発明を詳述するが、

本発明は、該実施例によって限定されるものではない。なお、実施例、参考例に記載の略称ないし略号は、以下のとおりのものである。

【0011】マニアティスの実験書：(T. Maniatis et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982)

N-3シード培地：コーンスティーブリカ-40g/ビート20g/酢酸アンモニウム2g/スイトース40gを水1リットルに溶解したもの。

【0012】メイン培地：ビート30g/脱脂大豆40g/コーンスティーブリカ-10g/酢酸アンモニウム5g/硫酸アンモニウム7g/硫酸カルシウム8g/炭酸カルシウム15g/スイトース60g/メチルオレイト41.5を水1リットルに含むもの。

【0013】CM培地：ショ糖20g/リン酸二水素カリウム0.5g/リン酸水素二カリウム0.5g/塩化カリウム0.5g/硫酸マグネシウム(7水塩)0.5g/硫酸鉄(II)(7水塩)0.01g/硝酸ナトリウム3g/イーストエキストラクト4g/ペプトン10gを水1リットルに溶解したもの。

CM固体培地：1.5%の寒天を含有するCM培地。

【0014】GAG培地：グリセロール40g/アスパラギン4g/塩化カルシウム0.1g/塩化ナトリウム0.1g/微量金属溶液〔硫酸マグネシウム(7水塩)4g/硫酸鉄(II)(7水塩)0.4g/硫酸マンガン(4水塩)0.16g/硫酸亜鉛(7水塩)0.4g/無水硫酸銅0.04gを水1リットルに溶解したもの〕25ミリリットル/0.1Mリン酸バッファー(pH7.0)30ミリリットルを水1リットルに含有する培地。

【0015】P-バッファー：0.6M塩化カリウム/0.01M塩化マグネシウム/0.025M塩化カルシウム

PEG溶液：25%ポリエチレングリコール(～400)/0.01Mトリス(pH8.0)/0.05M塩化カルシウム/0.6M塩化カリウム。

6×SSC：0.9M塩化ナトリウム/90mMクエン酸ナトリウム。

20×SET：3M塩化ナトリウム/0.4Mトリス(pH7.8)/20mMEDTA。

【0016】20×SSPE：塩化ナトリウム210g/リン酸二水素ナトリウム(2水塩)31.2g/0.5M EDTA 40ミリリットルを水1リットルに溶解したもの。

50×デンハルツ：フィコール5g/ポリビニルピロリドン5g/牛血清アルブミン5gを水0.5リットルに溶解したもの。

【0017】(参考例1)
デアセチルセファロスボリンCアセチルトランスフェラーゼ(DCPC-ATF)遺伝子の破壊

a. pDATF1の構築：図1に示される工程に従って、アクリレモニウム・クリソゲナムのDCPC-ATF遺伝子を破壊するためのプラスミドpDATF1を構築した。

【0018】以下に各工程を説明する。先ず、pATF1をSpe1で切断しDCPC-ATF遺伝子を含む3.7Kbの断片を分離精製した。該断片とXba1で切断し、アルカリフィオスファターゼ処理を施したpUC18(宝酒造販)とをT4リガーゼで連結することによりpSATF1を得た。次いで、pSATF1のEco47III(この制限酵素認識

10 部位はpSATF1上のDCPC-ATF遺伝子内部に一箇所だけ存在する)部位に、Xba1リinkerを挿入することによりpSATF1Xを得た。一方、pACTHY83をSpe1,Xba1で切断し、3.2KbのハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ発現単位断片(アクリレモニウム・クリソゲナム由来アクリチン遺伝子のプロモーターおよびターミネーター、細菌由来のハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子がアクリレモニウム・クリソゲナム内での発現に好適な配置で結合した断片)を分離精製した。次いで、該断片とXba1で切断し、アルカリフィオスファターゼ処理を施した上記pSATF1XをT4リガーゼで連結することによりpDATF1を得た。なお、本参考例で使用したpATF1は、アクリレモニウム・クリソゲナム由来DCPC-ATF遺伝子ならびにデアセトキシセファロスボリンC合成酵素/デアセチルセファロスボリンC合成酵素(アクリレモニウム・クリソゲナムの場合、単一のポリペプチドが両酵素活性を有していることが明かとなっている)遺伝子を含む7KbのBamHI断片がpUC18に挿入されたプラスミドであり、その造成法は、EP0450758に記載されている。また、pACTHY83は上述のとおりハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ発現単位を有するアクリレモニウム・クリソゲナム形質転換用ベクターであり、その造成法は、EP0450758に記載されている。

【0019】b. pDATF1によるアクリレモニウム・クリソゲナムの形質転換：pDATF1をSac1で線上化した後、アクリレモニウム・クリソゲナムIS-5株由来のプロトプラストに導入し、ハイグロマイシンBに耐性となった形質転換体を取得した。以下にその詳細を説明する。

【0020】CM固体培地上で30℃5日間生育させたアクリレモニウム・クリソゲナムIS-5の菌糸体をCM40培地50ミリリットルに接種し、回転式振とう機(250r.p.m)上、30℃で3日間培養した。さらに、該菌液1ミリリットルを50ミリリットルのGAG培地に接種して、30℃で20時間培養した。得られた培養液50ミリリットルを3500r.p.mで10分間遠心し、菌糸体を沈殿させた後、0.9%のNaClリットル溶液で洗浄し、0.01Mジチオスレイトールを含んだマクイルペイン緩衝液(0.1Mクエン酸、0.2Mリン酸ナトリウム、pH7.3)20ミリリットルに懸濁し、30℃で1時間、おだやかに振とうした。次いで菌糸体を3200r.p.m、10分間の遠心で沈殿さ

せ、P-バッファーで洗浄した後、ノボザイム（Novo社）を10mg/ミリリットルの濃度で含有するP-バッファー10ミリリットルに懸濁し、30°Cで1時間おだやかに振とうした。該反応液を800r.p.mで30秒間遠心して得た上清を、涙紙（TOYOFILTER PAPER 5A）を用いて涙過することにより、菌糸体とプロトプラストを分離した。

【0021】次いで、該涙液を3000r.p.mで5分間遠心し、プロトプラストを沈殿させた後、P-バッファーで1回洗浄し、プロトプラストが 3×10^8 個/ミリリットルの濃度となるようにP-バッファーに懸濁した。かくして得られたプロトプラスト懸濁液0, 1ミリリットルに、SacI切断により線上化したpDATF1 10 μ gを含む溶液10 μ リットルを加えた後、0, 05mリットルのPEG溶液を加え、かるく混合した。該混合液を氷上に25分間静置した後、同上のPEG溶液を1ミリリットル加えて、室温でさらに30分間静置した。かくして得られた形質転換プロトプラスト懸濁液を0, 2ミリリットルずつプロトプラスト再生培地〔文献（イソガイら：Agric.Biol.Chem.1987, 51, 2321-2329）に記載されているBRM培地〕を25ミリリットル含有するプレート上に広げ15°Cで20時間培養した。

【0022】次いで、該プレートに4, 5mgのハイグロマイシンBを含み、50°Cに保温した同上のBRM培地5ミリリットルを重層した後、28°Cで14日間培養した。その結果、ハイグロマイシンBに耐性となった形質転換体（以下、HYB形質転換体と略す）が二百数十株出現した。

【0023】c. 破壊株の選択：DCPC-ATFはセファロスボリンC生合成経路の最終ステップ、すなわち、デアセチルセファロスボリンCをセファロスボリンCに変換する反応を触媒する酵素である。したがって、この遺伝子が破壊された株はセファロスボリンC生成能を消失するはずである。上記（2）で得たHYB形質転換体より12株をランダムに選択し、その各々をN3シード培地50ミリリットルに接種し、25°Cで3日間振とう培養した（220r.p.m）。得られた培養液1ミリリットルをメイン培地30ミリリットルを含む500ミリリットルのフラスコに移植し、25°Cで4日間振とう培養した。かくして得られた培養液を遠心分離して得た上清を10倍希釈した後、高速液体クロマトグラフィーに供し、セファロスボリンCの検出を行った。高速液体クロマトグラフィーのカラムは、ZORBAX-BPNH2カラム（デュポン社製）を用い、移動相としては4%酢酸、4%メタノール、8%アセトニトリルからなる溶液を用いて、流速は2ミリリットル/分、検出波長は245nmを行った。その結果、調べた12株中2株の形質転換体（DAT2及びDAT8と命名）がセファロスボリンC生成能を失っていることが明かとなった。そして、

これら2株はDCPC-ATFの基質であるデアセチルセファロスボリンCを親株より多く蓄積した。また、予想どおり DAT2, DAT8の細胞破碎液中にDCPC-ATF活性は全く検出されなかった。

【0024】d. サザン法によるDCPC-ATF遺伝子破壊の確認：上記 DAT2, DAT8株およびその親株であるIS-5株からリーダー、プローダーの方法〔U.Raeder & P.B roda, Letters in Applied Microbiology (1985) 1, 17-20〕に従ってDNAを抽出し、SpeIもしくはBamHIでの切断、またStuIとXhoIによる二重切断を行った。ついで、これら切断DNAをアガロースゲル電気泳動した後、サザン法によりナイロンフィルター（ハイボンドN）に転写し、放射能ラベルしたpCCS1のEcoRI断片（DCPC-ATFの全コード領域を含む1,25kbのcDNA断片）とのサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、DAT8株では染色体のDCPC-ATF遺伝子とpDATF1上の破壊されたDCPC-ATF遺伝子とが2重交叉により、期待どおり置換されていることが示された。すなわち、DAT2, DAT8株ではSpeIによる切断で6,9Kb, BamHIで5,5Kbと3,2Kb, StuI+XhoIによる切断では5,9Kbの断片がそれぞれ該プローブとハイブリダイズし、親株で観察された位置（SpeI-3,7Kb, StuI+XhoI-2,7Kb, BamHI-7Kb）にハイブリダイゼーションシグナルは全く認められなかった（図2）。以上の結果、アクリレモニウム・クリソゲナムにおいても特定遺伝子の破壊が比較的容易に達成できることが判明した。

【実施例】

【0025】（実施例1）

IPNS遺伝子を含むコスミドクローンの単離

30 a. 遺伝子ライブラリーの作製：アクリレモニウム・クリソゲナム IS-5株（微研菌寄第11232号）の全DNAを特願平2-166566に記載した方法で抽出した。このDNA約100 μ gをMboIで部分消化した後、10~40%のショ糖密度勾配遠心法による分画操作を行って、30~40KbのDNA断片15 μ gを得た。該断片3 μ gとBamHIで切断し、アルカリホスファターゼ処理を施したコスミドベクターpBSF PKM6 1 μ gとをT4リガーゼで連結した後、パッケイジングエクストラクト（STRATAGENE社）を用いて入ファージ粒子内に封入した。かくして得た組換えコスミド懸濁液を適当に希釈し、E.coli HB101(ATC C33694)に感染させ、アンピシリン(100 μ g/ミリリットル)を含むLブロス寒天培地上に出現するコロニー数を計測した。その結果、この懸濁液は、 2×10^6 個の組換えコスミド粒子を含むことが判明した。このファージ液をアクリレモニウム・クリソゲナムの遺伝子ライブラリーとして保存した。なお、ここで使用したベクター pBSFP KM6はpBSF PKM5（該コスミドベクターの造成法は特願平2-219032に記載されている）をSfiIで切断し、DNAポリメラーゼクレノウ（Klenow）断片と4種のデオキシヌクレオチド3'リン酸を用いて平滑化した部

位に、BamHI リンカー（宝酒造：5'CCGGATCCGG3'）を常法によって挿入することにより作製した。

【0026】b. プローブの調製：S. M. Samsonらの報告〔Nature. 318, 191(1985)〕をもとに次の列を有するDNAオリゴマー：5' CTCCTTGTCAATGCCGAATAGG3' を自動DNA合成機（アプライド・バイオシステム社のDNAシンセサイザー・モデル380-A）を用いて、常法どおり合成した。次いで、該DNAオリゴマーの5'末端をT4ポリヌクレオチド・キナーゼと[γ -32P]ATPを用いて放射能ラベルした。これをIPSプローブと称し、ハイブリダイゼーション実験に供した。

【0027】c. ハイブリダイゼーションによるスクリーニング：a. で得たライブラリーの一部をE. coli HB101に感染させ、アンビシリン（シグマ社）100 μ g/ミリリットルを含むL-プロス寒天培地上に約10000個のコロニーとして生育させた後、これらをワットマン541沪紙へ移した。ついで、0.5N NaOH/ 1.5M NaClで処理して溶菌及びDNA変性を行い、0.5M Tris-HCl (pH7.0) / 1.5M NaClにより中和した後、上記IPSプローブとハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーションは、6 \times SET, 0.5%ノニデットP-40（シグマ社）、0.1mg/ミリリットル変性サケ精子DNAおよび終濃度1 \times 10⁵ cpm/ミリリットルでIPSプローブを含有する溶液を用いて、60°Cで1、5時間行った。この後6 \times SS C溶液を用いて室温で2回、つづいて60°Cで1回沪紙を洗浄した。次いで、この沪紙を乾燥させ、オートラジオグラフィーに供した。その結果、8個のハイブリダイゼーション陽性のコロニーが見いだされた。そこで陽性コロニーから6個をとりあげ、液体培養した後、常法によりコスミドDNAを調製した。得られたDNAをBamHIで切断し、アガロースゲル電気泳動にかけた後、上記IPSプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、すべてのクローンが有する3.2 KbのBamHI断片が該プローブとハイブリダイズしていた。そこで、COS1と命名したクローン由来の該断片をPUC18（宝酒造版）のBamHI部位に常法に従ってサブクローニングし、該断片の制限酵素地図を作製した。これを既に明かとなっているアクレモニウム・クリソゲナム由来のIPNS遺伝子のそれと比較したところ、両者はよく一致していた。さらに、この断片上NcoIからXbaIまでの塩基配列は、Samsonらが報告したIPNS遺伝子のN末端コード域の配列と完全に一致していた。以上の結果より、COS1のインサート中にIPNS遺伝子が含まれていることが確認された。またCOS1のHindIII, BamHI, SalIによる切断パターンをGutierrezら〔Journal of Bacteriology(1991), 173, 2354-2365〕によって報告されたアクレモニウム・クリソゲナムのACVS, IPNS遺伝子クラスター領域の制限酵素地図と比較することにより、COS1のインサートはIPNS遺伝子の下流、少なくとも20Kb以上に渡る領域を

カバーしていることが示唆された。

【0028】d. IPNS遺伝子の下流領域のサブクローニングと制限酵素地図の作製：c. で得たCOS1をSalIで切断したのち、アガロースゲル電気泳動を行い、サザンの方法により、ゲルからナイロンフィルターにDNAを転写した。該フィルターと32Pで放射能ラベルしたpIPS1の約1KbのPstI-BamHI断片（IPNS遺伝子のC末端コード域から下流へ向かう約1Kbの断片）とのハイブリダイゼーションを行ったところ、約7.3KbのSalI断片がハイブリダイズした。そこで、該断片をpUC18のSalI部位にサブクローニングし、挿入方向を異にする2種のプラスミドpIPD1, pIPD1'を得た。そして、これら2種のプラスミドを制限酵素解析に供し、該SalI断片の部分制限酵素地図を作製した。次ぎに、COS1をEcoRIで切断し、上記と同様にフィルターに転写した。ついで該フィルターと32Pで放射能ラベルしたpIPD1の約0.9KbpのKpnI断片（KpnI部位とベクターのマルチクローニングサイトのKpnI部位での切断で生ずる断片）とのサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、約3.9KbのEcoRI断片がハイブリダイズした。そこで、この断片をpUC18のEcoRI部位にサブクローニングし、プラスミドpIPD2を得た。次いで、このプラスミドを用いて該断片の制限酵素地図を作製し、上記SalI断片の地図とオーバーラップさせることにより図3に示すとおり、IPNS遺伝子の下流約10Kbに及ぶ領域の部分制限酵素地図を完成させた。なお、この地図の下段には、上記3種のサブクローンプラスミドpIPS1, pIPD1またはpIPD1', pIPD2中に含まれるインサートの領域を示した。

【0029】（実施例2）

転写領域の同定

上記pIPD1から数種の制限酵素断片を調製し、それをプローブとしてアクリレモニウム・クリソゲナムRNAとのノーザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、上記IPNS遺伝子の下流約10Kbに及ぶDNA断片上から、少なくとも2種の未同定RNAが転写されていること、すなわち、該断片上に2種の遺伝子が存在していることが明かとなった。以下、実験の詳細を記述する。

【0030】a. アクリレモニウム・クリソゲナムのポリA⁺ RNA抽出：CM固体培地上30°C、3日間生育させたアクリレモニウム・クリソゲナムIS-5の菌糸体をN3シード培地50ミリリットルに接種し、25°Cで3日間培養した。得られた培養液1ミリリットルをメイン培地30ミリリットルを含む500ミリリットルのフラスコに移植し、25°Cで3日間培養した。該菌液10ミリリットルから吸引沪過により集めた菌糸体を液体窒素中で凍結させ、乳鉢と乳棒を用いてすりつぶした。かくして得られた菌破碎粉末からTOTAL RNA ISOLATION KIT（インビトロジエン社）を用いて、その添付プロトコールに従って全RNA 800 μ gを抽出した。次いで、この全RNAからマニアティスの実験書に従って、オリゴ(dT)

11

セルロースクロマトグラフィー操作を行うことによりポリA⁺ RNA 27 μgを得た。

【0031】b. プローブの調製；上記pIPS1 の約0.4Kb のXhol-SacI 断片、約0.4KbpのClaI-BamHI断片ならびにpIPD1 の約2.2Kb のPstI断片と、上記実施例1d)で得た約0.9Kb の断片を32Pでラベルして、それぞれプローブA, B, C, Dと称しハイブリダイゼーションに供した。なお、使用したプローブの染色体上における位置は図3に示してある。

【0032】c. ノーザンハイブリダイゼーション；a.で得たポリA⁺ RNA 2 μgをマニアティスの実験書に記載された方法に従ってグリオキザールにより変性し、1, 1 %アガロースゲル中で電気泳動したのち、アマーシャム社の添付プロトコールに従ってナイロンフィルター（ハイボンド-N+、アマーシャム社）にアルカリ転写した。かくして得たフィルターをb)で調製した4種のプローブとそれぞれハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーションは、50 %ホルムアミド、5×SSPE, 5×デンハルツ、0. 1 %SDS, 100 μg/ミリリットルの変性サケ精子DNA、および終濃度2×10⁵ cpm/ミリリットルでプローブA, B, C, Dをそれぞれ含有する溶液中にて42°Cで15時間行った。ついで、これらのフィルターを0. 1 %のSDSを含む2×SSC中、室温で2回づつ洗浄し、さらに、0. 1 %のSDSを含む0. 2×SSC溶液中55°Cで30分間したのち、オートラジオグラフィーを行った。その結果、プローブAでは約1. 3Kb (IPNSmRNA)、プローブCでは約1. 4Kb、そして、プローブDでは約2. 1Kbのハイブリダイゼーションバンドが検出された。これに対してプローブBとハイブリダイズするバンドは全く検出されなかった。以上の結果、アクレモニウム・クリソゲナムのIPNS遺伝子から下流約10KbまでのDNA断片上には、少なくとも2種の遺伝子が存在していることが明かとなった。以後、IPNS遺伝子側に位置し1. 4Kbの転写産物を与える遺伝子をγ遺伝子、そして、IPNS遺伝子から遠い方に位置し2. 1Kbの転写産物を与える遺伝子をα遺伝子と称する。

【0033】(実施例3)

α遺伝子の解析

a. α-cDNAのクローニングとその構造解析；ベクタープライマー (pcDV1 Oligo(d-Tailed Plasmid Primer: ファルマシア社)、リンカー (pL1 Oligo(dG)-Tailed Linker: ファルマシア社)を使用し、上記ポリA⁺ RNA 4 μgから岡山・バーグ法 [Mol. Cell. Biol., 2 161(1982)]に従って、cDNAを組み込んだ組換えプラスミドを作製した。該プラスミドを一部使用して大腸菌 MC1061(ATCC5338)を形質転換し、アンビシリソ100 μgを含有するL-ブロス寒天培地上(プレート30枚)に約30000個のコロニーを生育させた。次いで、該コロニーをハイブリドN (アマーシャム社)に、アマーシャム社の添付ブ

12

ロトコールに従って転写し、DNAを固定した。かくして得たフィルターを実施例2(c)で得たプローブDとハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーションおよびフィルターの洗浄は、実施例2cと同様に行つた。その結果、4個のハイブリダイゼーション陽性コロニーが見いだされた。そこで、これらを取り上げ、液体培養したのちプラスミドDNAを調製した。そして、それをpAL1, pAL2, pAL3, pAL4と命名した。これらプラスミドをBam HIで切断し、アガロースゲル電気泳動により解析したところ、pAL3が最も長いcDNAインサートを含有することが判明した。さらに、このサイズ(2. 1Kb)はノーザン法により検出されたα-mRNAのそれとよく一致していた。そこで、pAL3が有するcDNAインサートの全塩基配列を、サンガーらの方法 [Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74 5463(1977)]に基づき決定した。塩基配列決定の具体的実験手技は、タカラのシークエンシングキット(宝酒造販)を用いて、その添付プロトコールに従つて行った。かくして決定された2113bpのDNA塩基配列を配列表(配列番号1)に示す。本DNA配列には、

10 116番目に始まるATGから2044番で終わるTAGまで、642個のアミノ酸をコードしうるオープンリーディングフレーム(ORF)が存在していた。該ORFから翻訳したアミノ酸配列を配列表(配列番号1)の塩基配列の下段に示した。

【0034】b. α遺伝子の構造解析；上記a.で明かとなったα-cDNA断片の塩基配列と実施例1で得たIPNS遺伝子下流域の地図とを照合したところ、α遺伝子はプローブDを含む、図3中のPstI④-EcoRV④間、3. 3Kbの断片内に含有されていると推定された。そこで、この断片の全塩基配列をaと同様の実験手技を用いて決定した。なお、決定した塩基配列は配列表(配列番号3: 2226番-5537番)に示した。予想どおりこの配列中には、上記cDNA配列から予想されたORFが完全に含まれていた。また、このORFは52bp、63、67、53bpから成る4個のインtronにより分断されていることが明かとなった。

【0035】c. α遺伝子の破壊；図4に示される工程に従って、アクレモニウム・クリソゲナムのα遺伝子を破壊するためのプラスミドpDAL1を構築した。以下に各工程を説明する。先ずα遺伝子全体を含有する約6Kbの断片(図3のPstI④-EcoRI⑤までの領域)を所持するプラスミドpALNC1を以下のとく作製した。pIPD1をPstIで切断したのち約5.6Kbの断片を分離精製し、該断片をT4リガーゼで自己閉環することによりpALN1を得た。次いで、該プラスミドをEcoRIで切断し、アルカリホスファタのち約4.9Kbの断片を分離精製した。該断片とpIPD2の約3.9KbのEcoRI断片(実施例1,d)とを、T4リガーゼで連結することによりpALNC1を得た。次に、このプラスミドからα遺伝子のコード域の約7割を含む50 1.8KbのEcoRV断片を欠失させ、そこにマーカー遺伝子

13

を挿入することによりpDAL1を作製した。すなわち、pALNC1をEcoRVで切断したのち約6.9Kbの断片を分離精製し、アルカリホスファターゼ処理を施した。一方、pACT HY83をSnaBIとSmaIで二重切断し、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子発現単位を含有する約3.5Kbの断片を分離精製した。次いで、この両者をT4リガーゼを用いて連結させることによりpDAL1を得た。DraI-SmaIで2重切断した上記pDAL1(10μg)を用いて、参考例1、bの方法に従ってアクリレモニウム・クリソゲナムIS-5株の形質転換を行ったところ、二百数十株のHYB形質転換体が得られた。この中からランダムに30株を選択し、参考例1b)と同様に培養して、セファロスボリンC生産性を調べて見た。その結果、DAL19, DAL30と命名した2株のセファロスボリンC生産性は親株であるIS-5株の20分の1以下にまで低下していることが判明した。また、サルモネラを用いたバイオアッセイ[Ottら、The Journal of Antibiotics, (1982)35, 637-638]を試みたところ、該培養液中にはセファロスボリンC前駆体の一種であるイソペニシリンNが多量に蓄積していることも明かとなった。これら2株およびIS-5株から参考例1、cと同様の方法に従って、染色体DNAを抽出し、EcoRIもしくはSaiIで切断した。ついで、この切断DNAをアガロースゲル電気泳動したのち、ナイロンフィルターに転写し、放射能ラベルしたpIPD1の約1.8KbのEcoRV断片もしくはpALNC1の約1.8KbのEcoRV断片とのザザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、DAL19およびDAL30株では染色体上のα遺伝子とpDAL1上の破壊された遺伝子とが期待どおり置換していることが判明した。すなわち、DAL19, DAL30株では、pIPD1由来のプローブを用いた場合、EcoRIによる切断で4.1Kbの位置にハイブリダイゼーションシグナルが検出され、親株で観察された位置(3.3Kb)にシグナルは全く認められなかった。また、pALNC1由来のプローブを用いた場合、親株ではSaiIによる切断で6.3Kbの位置にハイブリダイゼーションシグナルが明確に認められたが、DAL19およびDAL30株では如何なる位置にもシグナルは検出されなかった(図5)。以上の結果、本発明DNA断片上に存在するα遺伝子は、セファロスボリンC生合成に関与する新規なタンパクをコードしているということが明かとなった。

【0036】(実施例4)

γ遺伝子の解析

a. γ -cDNAのクローニングとその構造解析；実施例3、a.で作製したcDNAライブラリー（約30000 コロニー）を、実施例2(C)で得たプローブCによるハイブリダイゼーションにてスクリーニングしたところ、3個の陽性コロニーが見いだされた。実施例3、a.と同様に、これらのコロニーよりプラスミドを調製、解析した結果、pGAN2と命名したプラスミドが最長のcDNAインサートを含有していることが明かとなった。さらに、このインサー

14

トのサイズ(約1.4 Kb)は、ノーザン解析により検出された α -mRNAのそれとよく一致していた。そこで、pGAN2が保有するcDNAインサートの全塩基配列を実施例4と同様の実験手技を用いて決定した。かくして得られた1462 bpの塩基配列を配列表(配列番号2)に示す。本DNA配列には、52番目に始まるATGから1203番で終わるTAGまで、383個のアミノ酸をコードしうるORFが存在していた。該ORFより翻訳したアミノ酸配列を配列表(配列番号2)の塩基配列の下段に示した。

10 段に示した。

【0037】b. γ 遺伝子の構造解析；上記a. で明かとなつた γ -cDNAの塩基配列と実施例1で得たIPNS遺伝子下流域の地図とを照合したところ、 γ 遺伝子は実施例2において使用したプローブC、すなわち、図3中のPstI ③-PstI ④間、2.1Kbの断片内に含有されていると推定された。そこで、この断片の全塩基配列を決定した。かくして得られた配列を配列表（配列番号3：1番-2231番）に示した。予想どおりこの配列中に、上記cDNA配列から予想されたORFが完全に含まれていた。また、 γ 遺伝子は94bpからなる少なくとも1個のイントロンを所有しており、上記 α 遺伝子とは逆方向に転写されることなどが明かとなつた。

【0038】c. γ 遺伝子の破壊；第6図に示される工程に従って、アクレモニウム・クリソゲナムの γ 遺伝子を破壊するためのプラスミドpDNS1を構築した。先ずpIPD1'をNcoIとStuIで切断した後、約9Kbの断片を分離精製し、該断片の両末端をDNAポリメラーゼクレノウ断片と4種のデオキシヌクレオシド5'-3'リン酸を用いて平滑化した。次いで、この断片と実施例3、c)で得たP30 ACTHY83由来の約3.5KbのSnaBI-SmaI断片とを、T4リガーゼを用いて連結させることによりpDNS1を得た。SmaIで切断したpDNS1(10 μ g)を用いて、参考例1、b)の方法に従ってアクレモニウム・クリソゲナムIS-5株の形質転換を行ったところ、二百数十株のHYB形質転換体が得られた。この中から10株をランダムに選択し、参考例1、bと同様に培養して、セファロスボリンC生産性を調べてみた。その結果、DNS1,DNS5と命名した2株のセファロスボリンC生産性は、親株であるIS-5株の1/10分の1以下にまで低下していることが判明した。ま

40 た、驚くべきことに、これらの株も上記の破壊株と同様に、多量のイソペニシリンNを蓄積していることが明らかとなった。これら2株およびIS-5株から参考例1、cと同様の方法に従って、染色体DNAを抽出し、EcoRIもしくはSalIで切断した。これらDNA切断物をアガロースゲル電気泳動した後、ナイロンフィルターに転写し、サザンハイブリダイゼーションを行った。プローブは、EcoRI切断の場合はpIPD1の約0.35KbのEcoRI断片、そして、SalI切断の場合はpIPD1の約1.8KbのEcoRV断片をそれぞれ放射能ラベルして使用した。その結果、DNS1およびDNS5株では染色体上のNcoI①-SalI①断片

15

片がハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子発現単位と期待どおり置換していることが判明した。すなわち、DNS1およびDNS5株では、EcoRIによる切断で4,9Kb、SalIによる切断で3,9Kbの断片がそれぞれのプローブとハイブリダイズし、親株で観察された位置(EcoRI:3,3Kb, SalI:7,3Kb)にハイブリダイゼーションシグナルは全く認められなかった(図7)。

【0039】以上の結果、本発明DNA断片上に存在する γ 遺伝子は、先述の α 遺伝子と同様に、セファロスボリンC生合成に関与する新規なタンパクをコードしているということが明かとなった。さらに、これら遺伝子欠損株において蓄積する中間代謝物の解析結果から、両遺伝子はいずれもイソペニシリンNエピメラーゼ活性発現に関与していることも明かとなった。先述の参考例および実施例において制限酵素消化により生ずるDNA断片の分離は、すべて1%アガロースゲル電気泳動により行い、アガロースゲルからのDNA断片の単離精製は、ジーンクリーン(GENE CLEAN, フナコシ社販)を用いて、その添付プロトコールに従って行った。また特に断わらない限り、DNA断片の放射能ラベル化は、マルチプライムDNAラベリングシステム(Multiprime DNA labeling system: Amersham)を用いて、それに付属するプロトコールに従って行った。また、DNA断片の結合反応、該反応により生ずるプラスミドを用いた大腸菌の形質転換、得られた形質転換体からのプラスミドの調製お*

配列

ACTTACACCC	TTCTCCGAGA	CAGTCAAAGC	CACCAGCACC	AGCACCAATG	TCTCGGAGGC	60											
AAGGACATCG	CTCGCAAAGA	CACAAGCACA	CACGGGAGCA	TAACGGCAAT	CCCCA ATG	118											
Met																	
1																	
GCA	CCC	GGC	GGC	CTA	CTA	ACC	CTC	GCT	GGC	GCC	GCC	AGC	ACC	166			
Ala	Pro	Gly	Gly	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ser	Thr			
5						10						15					
GCC	GCC	GCT	GCC	TAC	CTC	GAC	GCC	AAG	CTT	CAC	CTC	ACC	AAG	GAC	214		
Ala	Ala	Ala	Ala	Tyr	Leu	Asp	Ala	Lys	Leu	His	Leu	Thr	Lys	Asp	Leu		
20						25						30					
AAC	CAG	CTC	GCC	CGC	GCC	GAA	CGG	GGG	GCC	CAG	AAC	TTC	GCC	AGA	262		
Asn	Gln	Leu	Ala	Arg	Ala	Glu	Arg	Gly	Ala	Gln	Asn	Phe	Ala	Arg	Ala		
35						40						45					
GTT	GAG	CAG	CGC	AAG	GCA	TCT	GGC	TTC	TTC	CTC	TTC	GAG	GCC	GCC	GCT	310	
Val	Glu	Gln	Arg	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Phe	Leu	Phe	Glu	Ala	Ala	Ala		
50						55						60			65		
GCC	CGC	CTC	GGC	GAT	GCA	CCT	TGC	ATC	TGG	TCG	CGC	GGG	CAC	CCC	GAG	358	
Ala	Arg	Leu	Gly	Asp	Ala	Pro	Cys	Ile	Trp	Ser	Arg	Gly	His	Pro	Glu		
70						75						80					
TAC	TCG	TGG	ACG	CAG	ACG	TAC	CAA	CGC	GCA	TGT	CAG	TAT	GGC	CAC	TAC	406	
Tyr	Ser	Trp	Thr	Gln	Thr	Tyr	Gln	Arg	Ala	Cys	Gln	Tyr	Gly	His	Tyr		
85						90						95					
TTC	CGC	GAT	CTG	GGC	GTG	GTG	GCC	GGG	CAG	CAC	GTC	GGT	GTT	TAT	CTG	454	
Phe	Arg	Asp	Leu	Gly	Val	Val	Ala	Gly	Gln	His	Val	Gly	Val	Tyr	Leu		

16

* よびその解析等の基本操作は、すべてマニアテスの実験書に記載された方法に準じて行った。

【0040】

【発明の効果】実施例に開示したとおり、本発明のDNA断片上には、アクレモニウム・クリソゲナムにおけるセファロスボリンC生合成に関与する新規遺伝子が少なくとも2個存在している。したがって、該断片あるいは、該遺伝子に対応するcDNA化合物を使用することにより、セファロスボリンC発酵能が向上したアクレモニウム・クリソゲナム株の創製が期待できる。

【配列番号】

【0041】配列番号：1

配列の長さ：2113

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：アクレモニウム クリソゲ ナム (Acremonium chrysogenum)

株名：IS5

配列の特徴

特徴を表わす記号：CDS

存在位置：116..2044

特徴を決定した方法：P

17

100	105	110		
TAC AAC TCG CCG GAG CTG ATG TTC ATC TGG ATG GGT CTA CTG TCT ATC			502	
Tyr Asn Ser Pro Glu Leu Met Phe Ile Trp Met Gly Leu Leu Ser Ile				
115	120	125		
GGT GCT GCT CCT GCC CTC ATC AAT TAC AAT CTC GGC TCT GAT GCT CTG			550	
Gly Ala Ala Pro Ala Leu Ile Asn Tyr Asn Leu Gly Ser Asp Ala Leu				
130	135	140	145	
GTT CAC TGT GTC CGC TTG TCG CGC TCG CGG TTT CTG ATA TAC GAT GAT			598	
Val His Cys Val Arg Leu Ser Arg Ser Arg Phe Leu Ile Tyr Asp Asp				
150	155	160		
GCG TCC GAT TGT TCC TCT CGC ATT CAC GAA GTT GGT GAG CGG CTT CGG			646	
Ala Ser Asp Cys Ser Ser Arg Ile His Glu Val Gly Glu Arg Leu Arg				
165	170	175		
GAT ATC AAT GTC GAG GCT ATC ATG CTC TCC GGC ACG CTG AAG GAA GAC			694	
Asp Ile Asn Val Glu Ala Ile Met Leu Ser Gly Thr Leu Lys Glu Asp				
180	185	190		
ATT GCC CGG AAA GAA ACA CAC AGG GCA CCG GTA GAT TGC TTC GAG GAC			742	
Ile Ala Arg Lys Glu Thr His Arg Ala Pro Val Asp Cys Phe Glu Asp				
195	200	205		
ACC AAG GTG CTG CTA CCG TTT GCT TTG ATG TAC ACT AGT GGT ACG ACT			790	
Thr Lys Val Leu Leu Pro Phe Ala Leu Met Tyr Thr Ser Gly Thr Thr				
210	215	220	225	
GGC CTG CCA AAG GCC GCA CCC ATC ACA GTG GCC AGG AAC TAT CCC TCT			838	
Gly Leu Pro Lys Ala Ala Pro Ile Thr Val Ala Arg Asn Tyr Pro Ser				
230	235	240		
GCT TCA CTG CTC CCA AAG ACA TTT GGG CAG AAA CCG GGC CCC AAC GGT			886	
Ala Ser Leu Leu Pro Lys Thr Phe Gly Gln Lys Pro Gly Pro Asn Gly				
245	250	255		
GAC CGC ACC TAC TAC TGC ATC CCG CTC TAC CAC GGA ACG GGG GGC ATC			934	
Asp Arg Thr Tyr Tyr Cys Ile Pro Leu Tyr His Gly Thr Gly Ile				
260	265	270		
GCG GCC ATG AAC GAC TTG ATG AGC GGA ATA TCC ATT GCT CTT GCG CCC			982	
Ala Ala Met Asn Asp Leu Met Ser Gly Ile Ser Ile Ala Leu Ala Pro				
275	280	285		
AAG TTC TCC TTG TCT CGC TTC TGG GAC GAT TGC ATA GAG AGC GGG TCA			1030	
Lys Phe Ser Leu Ser Arg Phe Trp Asp Asp Cys Ile Glu Ser Gly Ser				
290	295	300	305	
ACA ATA TTT GTC TAT GTC GGG GAA CTT ATT CGG TAC CTA CTC TCT GCT			1078	
Thr Ile Phe Val Tyr Val Gly Glu Leu Ile Arg Tyr Leu Leu Ser Ala				
310	315	320		
CCG GCC TCA CCA AAG GAC CGT CAG CAC CGC GTC CGT CTC GTC TGG GGG			1126	
Pro Ala Ser Pro Lys Asp Arg Gln His Arg Val Arg Leu Val Trp Gly				
325	330	335		
AAC GGA CTC AGC CCG GAA CTC TGG ACC AAA TTC CAG GAC CGC TTC GGC			1174	
Asn Gly Leu Ser Pro Glu Leu Trp Thr Lys Phe Gln Asp Arg Phe Gly				
340	345	350		
GTA TCG GAC ATC GGT GAA TTC TAC GCC AGC ACA GAA GGC GTC CTG ACA			1222	
Val Ser Asp Ile Gly Glu Phe Tyr Ala Ser Thr Glu Gly Val Leu Thr				
355	360	365		
CTC TTA AAA CAC TAC CGC GGC GGT GGT TTC GGC CTC GGC GCC GTC GGC			1270	

19

Leu Leu Lys His Tyr Arg Gly Gly Gly Phe Gly Leu Gly Ala Val Gly
 370 375 380 385
 CAC CAC GGT TGG CTC CTC CGC CGC AAG TTT CAC AAT GAC TAC GTA CCC 1318
 His His Gly Trp Leu Leu Arg Arg Lys Phe His Asn Asp Tyr Val Pro
 390 395 400
 GTC AGG ATC GAC CCG GAG ACG GGT GAC ATC TGG CGG TCG CCG AAG ACG 1366
 Val Arg Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asp Ile Trp Arg Ser Pro Lys Thr
 405 410 415
 GGC TTT GCC GAG CGA CTG CCG TAC GAG AGG GGC GGT GAG ATC CTG GCG 1414
 Gly Phe Ala Glu Arg Leu Pro Tyr Glu Arg Gly Gly Glu Ile Leu Ala
 420 425 430
 CGG CTC CCG TCA CGG TCA GCC TGG GCT GGG TAC TGG CAT GCT GAG GAG 1462
 Arg Leu Pro Ser Arg Ser Ala Trp Ala Gly Tyr Trp His Ala Glu Glu
 435 440 445
 GCG ACG CAG AAG AAG CTG GTG GAG AAT GTG TTT GAG AAG GGG GAT CTG 1510
 Ala Thr Gln Lys Lys Leu Val Glu Asn Val Phe Glu Lys Gly Asp Leu
 450 455 460 465
 TAC TTC CCG ACG GGT GAT GCT CTT CGA CGC GAT GCC GAC GGT CAC TGG 1558
 Tyr Phe Arg Thr Gly Asp Ala Leu Arg Arg Asp Ala Asp Gly His Trp
 470 475 480
 TAC TTT CTC GAC CGA CTT GGC GAC ACA TAC CGC TGG AAA GGA GAA AAC 1606
 Tyr Phe Leu Asp Arg Leu Gly Asp Thr Tyr Arg Trp Lys Gly Glu Asn
 485 490 495
 GTG TCC ACG ACC GAG GTA GGA CAA GTC CTG GGC TCA CAC GCA GAC ATT 1654
 Val Ser Thr Thr Glu Val Gly Gln Val Leu Gly Ser His Ala Asp Ile
 500 505 510
 GCC GAG GCC AAT GTC TAC GGC GTC CAG GTC CCC AAC CAC GAC GGG CGA 1702
 Ala Glu Ala Asn Val Tyr Gly Val Gln Val Pro Asn His Asp Gly Arg
 515 520 525
 GCC GGC TGC GCA GCC ATC GCA TTG AAG AAC GCG GCA ACC CCA GAC ACG 1750
 Ala Gly Cys Ala Ala Ile Ala Leu Lys Asn Ala Ala Thr Pro Asp Thr
 530 535 540 545
 TTG GAC TGG TCA CGG CTG ACG TCG CTC CTG CGG TCA GAG TTG CCC TCC 1798
 Leu Asp Trp Ser Arg Leu Thr Ser Leu Leu Arg Ser Glu Leu Pro Ser
 550 555 560
 TAC GCC GTT CCT GTC TTC ATT AGG GTG CGG GAG ACG GTG GGA GGC ATG 1846
 Tyr Ala Val Pro Val Phe Ile Arg Val Arg Glu Thr Val Gly Gly Met
 565 570 575
 AGC ACG GAT AAC CAT AAA CAC AAC AAG GTG CCA CTC CGC GAC GAG GGG 1894
 Ser Thr Asp Asn His Lys His Asn Lys Val Pro Leu Arg Asp Glu Gly
 580 585 590
 GTC GAC CGG CGC TCC ATG GGC AGC AAG GTC CCT GGA GGT GAA AAG GAT 1942
 Val Asp Pro Arg Ser Met Gly Ser Lys Val Pro Gly Gly Glu Lys Asp
 595 600 605
 CGC TTC TTC TGG CTG CGG GCC GGT GCG AGC AAG TAT GTT CCC TTT ACC 1990
 Arg Phe Phe Trp Leu Pro Ala Gly Ala Ser Lys Tyr Val Pro Phe Thr
 610 615 620 625
 GAG CGG GAC TGG GAT CTA CTG TCC GGC CAG TCG GCG GCT CGG CCA AGA 2038
 Glu Arg Asp Trp Asp Leu Leu Ser Gly Gln Ser Ala Ala Arg Pro Arg
 630 635 640

21

22

CTC TAGTTGCTAT TAACGGGACC CATCGACGCG TGAAACGATG TAACATAGAA
 Leu
 ACAAAATGTG GCTTGCAAAA CA

2091

2113

【0042】配列番号: 2

配列の長さ: 1462

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

* 生物名: アクレモニウム クリソゲ ナム (Acremonium chrysogenum)

株名: IS5

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 52..1203

* 10 特徴を決定した方法: P

配列

CCGACATTAC ATGTTGAGT CTTGACCATT CACGCGGTTA ATCCCACCTC G ATG GAC 57
 Met Asp
 1
 CCC TCT CGC CCA CAT CGG CTA TCC GGC AAG CTT GTC GTA GAG CTC GCG 105
 Pro Ser Arg Pro His Pro Leu Ser Gly Lys Leu Val Val Glu Leu Ala
 5 10 15
 GGG CTA GCC CCA GGC CCA TTC TGT GGC ATG CTC TTG GCA GAC TAT GGC 153
 Gly Leu Ala Pro Gly Pro Phe Cys Gly Met Leu Ala Asp Tyr Gly
 20 25 30
 GCC TCA GTA CTC CGC ATC GAC GGA CCG CGA TCC CCA AAG GGG GAC GTC 201
 Ala Ser Val Leu Arg Ile Asp Gly Pro Arg Ser Pro Lys Gly Asp Val
 35 40 45 50
 CTG GCG AGG AAC AAG TCG TCC ATC TGC ATC GAC TTG AAG CAT CCG CCC 249
 Leu Ala Arg Asn Lys Ser Ser Ile Cys Ile Asp Leu Lys His Pro Pro
 55 60 65
 TCA CGC AAG GTG CTC CTC TCC ATC CTG TCC CGC GCG GAC GTG CTC ATC 297
 Ser Arg Lys Val Leu Leu Ser Ile Leu Ser Arg Ala Asp Val Leu Ile
 70 75 80
 GAC CCG TTC CGG CCC GGC GTC CTG GAG CGT CTG GGG CTC TCC CCC ACA 345
 Asp Pro Phe Arg Pro Gly Val Leu Glu Arg Leu Gly Leu Ser Pro Thr
 85 90 95
 GAG GTC CTT CTC AAG GCG AAT GCC CGC CTG GTG GTC GCC CGT CTC ACC 393
 Glu Val Leu Lys Ala Asn Ala Arg Leu Val Val Ala Arg Leu Thr
 100 105 110
 GGC TTC CGC CGA GAT GGC AAG TAC CAG GAC ATG GCA GGC CAT GAT ATC 441
 Gly Phe Arg Arg Asp Gly Lys Tyr Gln Asp Met Ala Gly His Asp Ile
 115 120 125 130
 AAC TAC CTC GCC GTG TCT GGC GTC CTG GCT ATG CTT GGT AGG GCA GGC 489
 Asn Tyr Leu Ala Val Ser Gly Val Leu Ala Met Leu Gly Arg Ala Gly
 135 140 145
 GAG AAT CCC TTC CCG CCG GCC AAC ATC CTC GGC GAC TTT GCC GGA GGG 537
 Glu Asn Pro Phe Pro Pro Ala Asn Ile Leu Gly Asp Ala Gly Gly
 150 155 160
 GGC GCC ATG TGC GTC GTG GGA ATT CTG CTG GCG CTC GTA TCG CGC GAT 585
 Gly Ala Met Cys Val Val Gly Ile Leu Leu Ala Leu Val Ser Arg Asp
 165 170 175
 GCC ACG GGG CTT GGC CAG GTC GTC GAG GCC AAC ATG GTG GAC GGG TCT 633
 Ala Thr Gly Leu Gly Gln Val Val Glu Ala Asn Met Val Asp Gly Ser
 180 185 190

amino acids
126-134

23	24	
GCG TAC CTG GCC ACG ATG CCG CGC CTG GCG ACC AAG ACG CCC TTC TGG	681	
Ala Tyr Leu Ala Thr Met Pro Arg Leu Ala Thr Lys Thr Pro Phe Trp		
195 200 205 210		
GGT TCC CCG CGG GGC GAG AAT GTC CTG GAC GGA GGG TGC CCC TGG TAT	729	
Gly Ser Pro Arg Gly Glu Asn Val Leu Asp Gly Gly Cys Pro Trp Tyr		
215 220 225		
GCG ACA TAC CGG ACA AAG GAC CCC GGC GGG AAG TAC ATG GCC GTG GGA	777	
Ala Thr Tyr Arg Thr Lys Asp Pro Gly Gly Lys Tyr Met Ala Val Gly		
230 235 240		
GCG CTG GAG CCT CAC TTC TAC GAG GTG CTG GTG CGA GGT CTG GGC CTG	825	
Ala Leu Pro His Phe Tyr Glu Val Leu Val Arg Gly Leu Gly Leu		
245 250 255		
GAC AAG ACG GAC CTG CCT CCG CGG GAG GAT AGG GCC AAT TGG CCG AGA	873	
Asp Lys Thr Asp Leu Pro Pro Arg Glu Asp Arg Ala Asn Trp Pro Arg		
260 265 270		
CTG AGG GCG CTA TTC GAG GCA AAA TTT GCG GAG AGG ACG CGC AGC GAG	921	
Leu Arg Ala Leu Phe Glu Ala Lys Phe Ala Glu Arg Thr Arg Ser Glu		
275 280 285 290		
TGG GCG GAG GTC TTT GAC GGG ACG GAT GCC TGC GTC ACC CCG GTC CTG	969	
Trp Ala Glu Val Phe Asp Gly Thr Asp Ala Cys Val Thr Pro Val Leu		
295 300 305		
GAG CAA GGT GAG CTG GAG AAG GCC GGC TTC GAA CAA CGG CTT CCC GTG	1017	
Glu Gln Gly Glu Leu Glu Lys Ala Gly Phe Glu Gln Arg Leu Pro Val		
310 315 320		
AAT TTG GGG GCC ACG CCG GGA AAG CCT ATT CTT CCC GGA CAG GGT GAT	1065	
Asn Leu Gly Ala Thr Pro Gly Lys Pro Ile Leu Pro Gly Gln Gly Asp		
325 330 335		
TGG ACG GGC GGG ACC CTT GCC AAG GGC CAT GGA GGA GAG GAG ATC CTG	1113	
Trp Thr Gly Thr Leu Ala Lys Gly His Gly Glu Glu Ile Leu		
340 345 350		
CGC CGG TGG ATT GGG TGG GAA AGG GGG GTT GAC TAC CAC GTT GAG GAG	1161	
Arg Arg Trp Ile Gly Trp Glu Arg Gly Val Asp Tyr His Val Glu Glu		
355 360 365 370		
AAT AGC GGA ATT CTC GTC GCT TGT TCG CGG GAA AAG TTG TAGGCAGGCA	1210	
Asn Ser Gly Ile Leu Val Ala Cys Ser Arg Glu Lys Leu		
375 380		
GGCAGGCCAT GCTGGTACAT GCATGCAATG TTGGCCGCTT ATGTACGTAT GTGCATACAT	1270	
AAACATTGAC AATAGTGGTG TCATGAAGGA GGAGGGGGGG GGTGGGTTTC GGCCCCCTGAC	1330	
GGTGGCTTGA TCGGGACATG GACGCCGAT CGTCAGCGGA GTCAAGCCTC CCGACAGACC	1390	
TGCCGACCCG ACATCCGAGT ATCTGTACGT AAGATTGCACT ACCAACAAATG TACACCTACT	1450	
TCCTACGGTT CC	1462	

【 0 0 4 3 】配列番号 : 3

* chrysogenum)

配列の長さ : 5537

株名 : IS5

配列の型 : 核酸

配列の特徴

鎖の数 : 二本鎖

特徴を表す記号 : intron

トポロジー : 直鎖状

存在位置 : 1613..1520 3860..3911 4178..4240 435

配列の種類 : Genomic DNA

7..4423 4839..4891

起源

特徴を決定した方法 : E

生物名 : アクレモニウム クリソゲ ナム (Acremonium *

配列

25

CTGCAGTAAT TACGCCCTGT ATTATCTAG TGGGACAGCA GCATGGTTGA GAGTCCCCAA 60
 CGAGGATGAA GACGGTAAA AGGGAGGTG CATCCCAAGG CTGTGAATT CAACACAGC 120
 AGCACGATT TTCTTTTC ATTCGCTCC ATGCAACCTC CAGAGAGAAA ATCCTGGAAC 180
 CGTAGGAAGT AGGTGTACAT TGTTGGTATG CAATCTTACG TACAGATACT CGGATGTCGG 240
 GTCGGCAGGT CTGTGGAG GCTTGACTCC GCTGACGATG CGCGCTCCAT GTCCCGATCA 300
 AGCCACCGTC AGGGGCCAA ACCCACCCCC CCCCTCTCC TTCACTGACAC CACTATTGTC 360
 AATGTTTATG TATGCCACATA CGTACATAAG CGGCCAACAT TGCACTGCATG TACCAAGCATG 420
 GCCTGCCTGC CTGCTACAA CTTTCCCGC GAACAAGCGA CGAGAATTCC GCTATTCTCC 480
 TCAACGTGGT AGTCAACCCC CTTTCCAC CCAATCCACC GGCGCAGGAT CTCCCTCCCT 540
 CCATGGCCCT TGGCAAGGGT CCCGCCGTC CAATCACCT GTCCGGAAAG AATAGGCTTT 600
 CCCGGCGTGG CCCCCAAATT CACGGGAAGC CGTTGTTCGA AGCCGGCCTT CTCCAGCTCA 660
 CCTTGCTCCA GGACGGGGT GACGAGGCA TCCGTCCTG CAAAGACCTC CGCCCACTCG 720
 CTGCGCGTCC TCTCCGAA TTTGCTCG AATAGCGCC TCAGTCTGG CCAATTGGCC 780
 CTATCCTCCC CGGGAGGCAG GTCCGCTTG TCCAGGCCA GACCTCGAC CAGCACCTCG 840
 TAGAAGTGAG GCTCCAGCGC TCCCACGGCC ATGTACTTCC CGCCGGGTC CTTTGTCCGG 900
 TATGTCGCAT ACCAGGGCA CCCTCCGTC AGGACATTCT CGCCCGCGG GGAACCCCAG 960
 AAGGGCGTCT TGGTCGCCAG GCGCGGCATC GTGGCCAGGT ACGCAGACCC GTCCACCATG 1020
 TTGGCCTCGA CGACCTGGCC AAGCCCGTG GCATCGCGOG ATACGAGCGC CAGCAGAATT 1080
 CCCACGACGC ACATGGCGCC CCCTCCGGCA AAGTCGCCA GGATGTTGGC CGGCAGGAAAG 1140
 GGATTCTCGC CTGCTCTACC AAGCATAGCC AGGACGCCAG ACACGGCGAG GTAGTTGATA 1200
 TCATGGCCTG CCATGTCTTG GTACTTGCA TCTCGCGGA AGCCGGTGGAG ACGGGCGACC 1260
 ACCAGGCGGG CATTGCTT GAGAAGGACC TCTGTGGGG AGAGCCCCAG ACGCTCCAGG 1320
 ACGCGGGCC GGAACGGGTC GATGAGCACG TCCGCGCGG ACAGGATGGA GAGGAGCAC 1380
 TTGCGTGAGG GCGGATGCTT CAAGTCGATG CAGATGGACG ACTTGTCTT CGCCAGGACG 1440
 TCCCCCTTG GGGATGCGG TCCGTCGATG CGGAGTACTG AGGCAGCATA GTCTGCCAAG 1500
 AGCATGCCAC AGAATGGCC TGGAGTGC GAGTTAGTGC GTAGCGCAA GAAGCGGCTT 1560
 CTATGCGTAG GCCTCTCGGC AGAGCAACAT GAAAGTGGCT ATGGATGACG GACCTGGGC 1620
 TAGCCCGCG AGCTCTACGA CAAGCTTGC GGATAGCGGA TGTGGCGAG AGGGTCCAT 1680
 CGAGGTGGGA TTAACCGGT GAATGGTAA GACTACAACA TGTAAATGTG GCAGGTGGTC 1740
 AGCGGAAATC CCACCATGCC ATTGATGTT ATTGAGTGC GTACTTGCA TCTCGAAGCC 1800
 TGCCCTGGCA TGGATGGTGC AGCGTGGTGA GGTGGCATTG GCGTAACCTC TACCCACGTG 1860
 TACAGACGAC TCGGGTCCGA TACCGCGCAG CGACTATGAA AACATGGGTG GATATCAAAA 1920
 GCGCATCGGG GACGTTGAAG ATTCTTGTCT CGGCATGTAC TCTGCTGTAG TATCAAGGGC 1980
 GGAGCCTGTG CATCGAAGCT GAAAATCTAG CTGCACCAAG GACGGGGCGC ATGCCAGTGT 2040
 CCAAGAAATAG ACTCATCGTC TCCATCCTCC CATCATGAAT GAAACCTGCC CAGTTGGGC 2100
 AGCAGGTTGT TGCCAAGTAA TAACCTCAGA CATAATTCTAT AGTCATCCAG AGCACAGACT 2160
 ACGGATACAC GACCTCATTA TGGCATGGCA TGTATGCAGA CTGTGCGCCT AAATCAGGCA 2220
 TCATTCTGCA GTACAAATGT TGCCTCCGAT GGTCGTGTC TTGTATTACT TGGCGGAGCA 2280
 TGTACTGTAA TATCACCCCC CTGTCATGTA CGGAGAAACG CAAGTATCAA TGTAAATGTTC 2340
 GTGCAAGGTG GGTGTACATT ATAGCGCTC CTGTGGCAGC ACAGATGTAC ATGTACAAC 2400
 TACATAGTC CGGGTACTTG CTATTTAAAG ACGCAGGGGG CGGGCCCGCT CGATCCAGTC 2460
 AAGGCACAGC ATCTGATTG ATCCAGACCA ATGCTTAGTA CATGTAACCT TAACCACTAG 2520
 CTCTTAAGCT GTAAGCACTT CTGCCCGCGG AGCCGACCCG CCCTCACCCC CTGTCCGGCT 2580
 GTTGTACCGT ACGAAGGGAT GAGTTGGCCA CGGTGTTCC ACCACGTACG CTATGCGTAC 2640
 AGTATGCGCT GCTTGGCGTC GGTCTGGGC AGTGAATATC ATCCCGTACG CAAGAGTCAG 2700
 CGTATTACTG TCCATGTTCT TTTACGTAAG GTACAATGTT TGTATGTAGT CGAGACTATA 2760
 ACCTGGACAC GCATGGCCGC GGCCATATCC GACAGGAACA GTCCCTGAAT CTTCAGTGCC 2820
 TGTTCCACG GGCGCGTAC AGTACCGTAC GGAGTCCGGA CGTACGGACA CCTCTTGTAA 2880
 GTGCGGCCGC AACATCGCG CCGATCTCCC TCCATCCATG TCCCTGGCC CCCTCCCAA 2940
 AGGGCCCAA CCCACAGACC CGCCACACCA TCAGGTCTCC CAAGCTTCTG GGTGCCGAGG 3000

27

28

CTAGCAGTCT TCAACAACTA TTGTCATA CTGGTTGTGT CCGTGTGG TCAACTTTG	3060
GACTCCGAT CGCACGATCA CTTACACCT TCTCCGAGAC AGTCAAAGCC ACCAGCACCA	3120
GCACCAATGT CTCGGAGGCA AGGACATCGC TCGAAAGAC ACAAGCACAC ACGGGAGCAT	3180
AACGGCAATC CCCAATGGCA CCCGGCGGCC TACTAACCT CGCTGGGCC GCTGCCGCCA	3240
GCACCGCGC CGCTGCCTAC CTGACGCCA AGCTTCACCT CACCAAGGAC CTCACCCAGC	3300
TCCGCCCCGC CGAACGGGGG GCCCAGAACT TCGCCAGAGC TGGTGGACAG CGCAAGGCAT	3360
CTGGCTTCTT CCTCTTCGAG GCGGCCGCTG CCCGCCCTGG CGATGACCT TGATCTGGT	3420
CGCGCGGGCA CCCCCAGTAC TCGTGGACGC AGACGTACCA ACGCGCATGT CAGTATGGCC	3480
ACTACTTCCG CGATCTGGC GTGGTGGCCG GGCAGCACGT CGGTGTTAT CTGTACAAC	3540
CGCCGGAGCT GATGTTCATC TGGATGGTC TACTGTCTAT CGGTGCTGCT CCTGCCCTCA	3600
TCAATTACAA TCTCGGCTCT GATGCTCTGG TTCACTGTGT CCGCTTGTC CGCTCGCGGT	3660
TTCTGTATATA CGATGATGCG TCCGATTGTT CCTCTCGCAT TCACGAAGTT GGTGAGCGGC	3720
TTCGGGATAT CAATGTCGAG GCTATCATGC TCTCCGGAC GCTGAAGGAA GACATTGCC	3780
GGAAAGAAC ACACAGGGCA CCGGTAGATT GCTTCGAGGA CACCAAGGTG CTGCTACCC	3840
TTGCTTGAT GTACACTAGG TGAGTAAAGC CTCGGACTTC ACCCACCAGT TGACATTTCT	3900
CACGGCAAAA GTGGTACGAC TGGCCTGCCA AAGGCGCAC CCATCACAGT GGCCAGGAAC	3960
TATCCCTCTG CTTCACTGCT GCCAAAGACA TTTGGCAGA AACCAGGGCC CAACGGTGAC	4020
CGCACCTACT ACTGCATCCC GCTCTACCAC GGAACGGGGG GCATCGCGC CATGAACGAC	4080
TTGATGAGCG GAATATCCAT TGCTCTTGCG CCCAAGTTCT CTTGTCTCG CTTCTGGAC	4140
GATTGCATAG AGAGCGGGTC AACAATTT GTCTATGGTA AGCCACTACT CTCCCTTGGT	4200
ACCCCTCTC GACTTGTGG CCGCCCTGAC GAGTGTACAG TCGGGGAACT TATTGGTAC	4260
CTACTCTCTG CTCCGGCCTC ACCAAAGGAC CGTCAGCACC GCGTCCGCT CGTCTGGGG	4320
AACGGACTCA GCCCGGAACT CTGGACCAAA TTCCAGGTAT GATCCCCCTT TACTTCGGTC	4380
CAGCCCCATC GAAACCATAG GATTGACACC AAGGACACAA CAGGACCGCT TCGGCGTATC	4440
GGACATCGGT GAATTCTACG CCAGCACAGA AGGCGTCTG ACACTCTAA AACACTACCG	4500
CGGCGGTGGT TTCCGGCTCG GCGCCGTCGG CCACACCGT TGGCTCCCTC GCGCAAGTT	4560
TCACAATGAC TACGTACCCG TCAGGATGCA CCCGGAGACG GGTGACATCT GGCGGTGCGC	4620
GAAGACGGGC TTTGCCGAGC GACTGCCGTA CGAGAGGGGC GGTGAGATCC TGGCGCGGCT	4680
CCCGTCACGG TCAGCCTGGG CTGGGTACTG GCATGCTGAG GAGGCGACGC AGAAGAACG	4740
GGTGGAGAAT GTGTTTGAGA AGGGGGATCT GTACTTCCGG ACGGGTGATG CTCTTCGACG	4800
CGATGCCGAC GGTCACTGGT ACTTTCTCGA CCGACTTGGT ACCTTATCCC TGCTACAATC	4860
GCAGAGTGAC AATGCTAACAC GTGAATACCA GGCGACACAT ACCGCTGGAA AGGAGAAAC	4920
GTGTCCACGA CCGAGGTAGG ACAAGTCCCTG GGCTCACACG CAGACATTGC CGAGGCAAAT	4980
GTCTACGGCG TCCAGGTCCC CAACCACGAC GGGCGAGCG GCTGCCGACG CATCGATTC	5040
AAGAACGCGG CAACCCAGA CACGTTGGAC TGGTCACGGC TGACGTCGCT CCTGCCGTCA	5100
GAGTTGCCCT CCTACGCCGT TCTGTCTTC ATTAGGGTGC GGGGAGACGGT GGGAGGCATG	5160
AGCACCGATA ACCATAAACAA CAACAAGGTG CCACTCCGCG ACGAGGGGGT CGACCCCGCG	5220
TCCATGGCA GCAAGGTCCC TGGAGGTGAA AAGGATCGCT TCTTCTGGCT GCCGGCGGCT	5280
CGCGACAAGT ATGTTCCCTT TACCGAGCGG GACTGGGATC TACTGTCGG CCAGTCGGCG	5340
GCTCGGCCAA GACTCTAGTT GCTATTAACG GGACCCATCG ACGCGTGAAC CGATGTAACA	5400
TAGAAAACAA ATGTGGCTTG CAAAACACAT GTAAATTCCGC ATAAAGCCTG AAGAGCGTAA	5460
ACACAAACATA GAGGGCAGAT TCGGCCGAAC TCAACCGGCT ATGACTCCGT AACGCGCGGA	5520
ACAACCAACTC AGATATC	5537

【図面の簡単な説明】

【図1】参考例で使用したD C P C - A T F 遺伝子破壊用プラスミド pDATF1 の作製過程を示す。

【図2】IS-5株及びD C P C - A T F 遺伝子破壊株の染色体上におけるD C P C - A T F 遺伝子並びにその隣接領域の部分制限酵素地図を示す。D C P C - A T F c D N Aプローブとハイブリダイズする制限酵素断片の位置*

*とサイズをそれぞれ地図の下に示している。

【図3】本発明D N A断片の部分制限酵素地図を示す。重複する制限酵素認識部位に関しては、便宜上図中左から右に通し番号を付した。

【図4】本実施例3で使用した α 遺伝子破壊用プラスミド pDAL1の作製過程を示す。

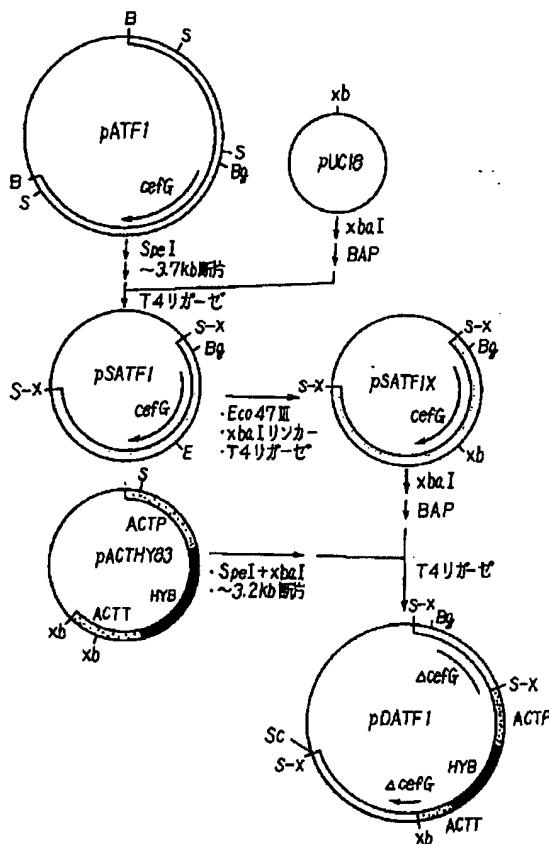
【図5】IS-5株および α 遺伝子破壊株の染色体上における

る α 遺伝子ならびにその隣接領域の部分制限酵素地図を示す。pIPD1の1.8kbのEcoRV断片プローブとハイブリダイズするEcoRI断片の位置とサイズならびにpALNC1の1.8KbのEcoRV断片とハイブリダイズするSacI断片の位置とサイズをそれぞれ地図の下に示している。

【図6】サザンハイブリダイゼーションの結果を示している。

【図7】本実施例4で使用した γ 遺伝子破壊用プラスミドpDNS1の作製過程を示す。なお、図1、図4および図7で使用した略称ないし略号は、以下のとおりのものである。B: BamHI, S: SpeI, Bg: BgIII, Xb: XbaI, E: Eco47III, S-X: SpeIとXbaIの連結部位, P: Ps tI, S: SalI, RI: EcoRI, R: EcoRV, Sn: SnaBI, Sm: SmaI, D: DraI, St: StuI, N: NcoI, Sn-RV: SnaBIとEcoRVの連結部位, Sm-RV: SmaIとEcoRVとの連結部位, St-Sm: StuIとSmaIの連結部位、BAP: アルカリホスファターゼ, cefG: デアセチルセファロスボリンC

【図1】

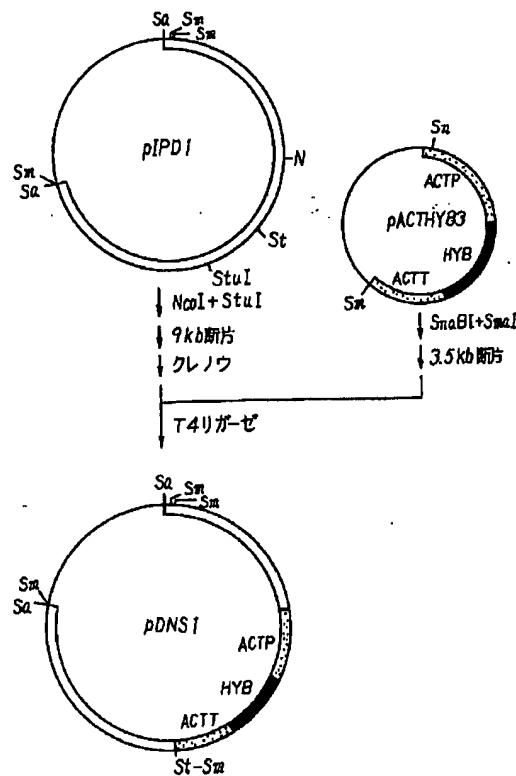


アセチルトランスフェラーゼ (DCPC-ATF) 遺伝子, Δ cefG: DCPC-ATF遺伝子の一部, α : 本発明により得られた新規遺伝子 α , $\Delta\alpha$: α 遺伝子の一部, ACTP: アクレモニウム・クリソゲナ由来アクチン遺伝子プロモーター, ACTT: アクレモニウム・クリソゲナム由来アクチン遺伝子ターミネーター, HYB: ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子。

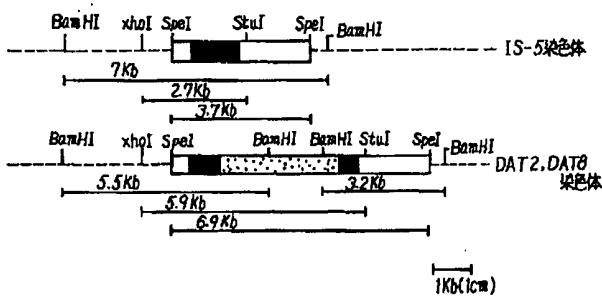
【図8】IS-5株および γ 遺伝子破壊株の染色体上における γ 遺伝子ならびにその隣接領域の部分制限酵素地図を示す。pIPD1の1.8KbのEcoRV断片プローブとハイブリダイズするSalI断片の位置とサイズならびにpIPD1の0, 35KbのEcoRI断片プローブとハイブリダイズするEcoRI断片の位置とサイズをそれぞれ地図の下に示している。

【図9】サザンハイブリダイゼーションの結果を示している。

【図7】

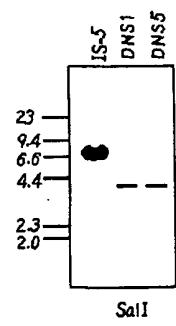
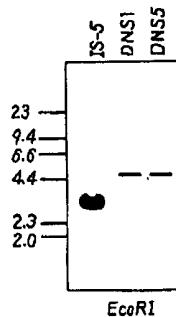


【図2】

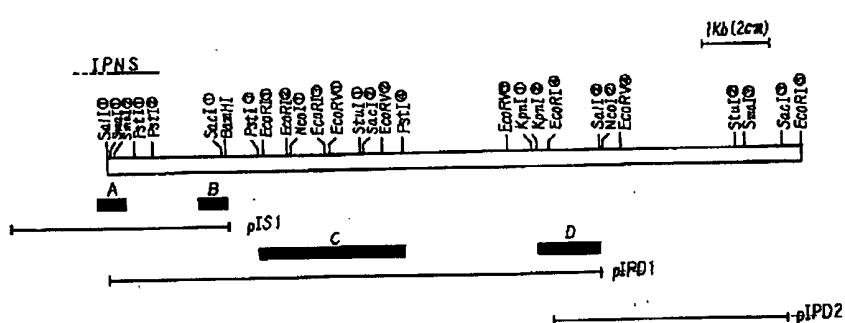


- は *DCP-ATF* の全コード領域 (2個のイントロンを含む)
- は *pDATF1* に含まれる *DCP-ATF* 遺伝子の近接領域
- ▨ はアクリモニウム・クリソゲナム由来アクトин遺伝子のプロモーター、ターミネーターおよびハイブロマイシンBホスホトラソスフェラーゼ遺伝子からなるマークー領域

【図9】

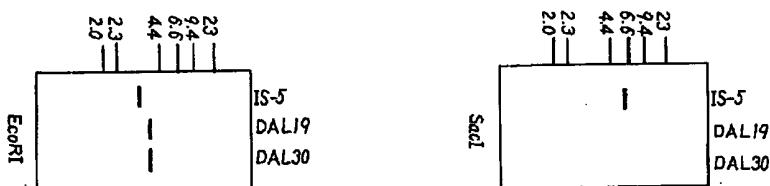


【図3】

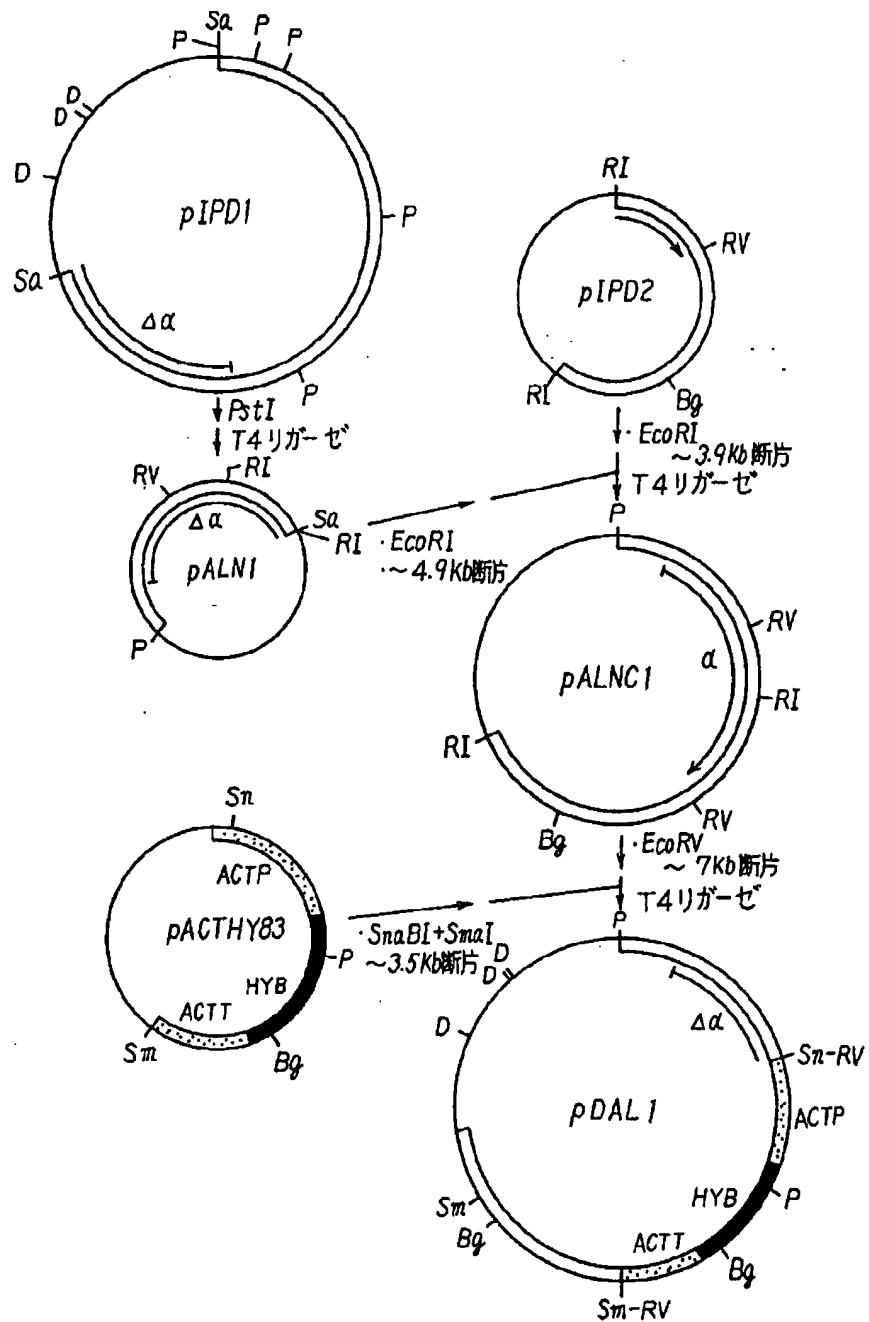


- は該地図の作成に使用した3種のプラスミド *pIS1*, *pIPD1*, *pIPD2* のインサード部分を示す。
- は実施例2のノーサンハイブリダイゼーションで使用した4種のプローブの位置を示す。なお、*SalI*のから *EcoRI*までの間に存在する複数の *SalI*部位に関しては、その位置を決定していないないので記載していない。

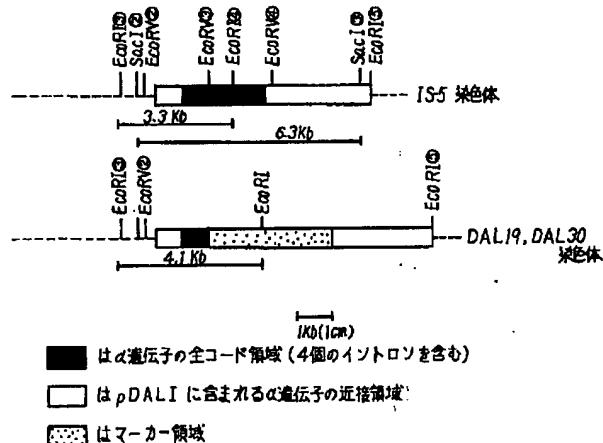
【図6】



【図4】



【図5】



〔図8〕

